

**Heparintoleranz in Vivo und in
Vitro bei obliterierender
Arteriopathie**

Hector Xavier Samaniego

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555206_0077

AUS DER
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

**Heparintoleranz in Vivo und in
Vitro bei obliterierender
Arteriopathie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hector Xavier Samaniego
aus El Paso, Texas/USA

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Professor Dr. W. SEITZ

Dekan:

Professor Dr. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1960



E I N L E I T U N G

Problemstellung

Nach neueren Arbeiten, besonders von gefässpathologischer Seite, haben recidivierende murale Thrombenbildungen im arteriellen Gefässsystem mit nachfolgendem endothelialem Überzug als relativ häufiges Vorkommnis zu gelten. Diese organisierten Fibrinablagerungen bewirken dann Ernährungsstörungen der Intima und eines Teils der Media des Gefässes und sind dadurch als wichtige Teilursache nachfolgender atherosklerotischer Veränderungen anzusehen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, bei einer grösseren Zahl von Patienten mit gesicherten arteriellen Verschlüssen der Becken- bzw. Bein-Gefässe auf atherosklerotischer Basis im Hinblick auf die abgelaufenen thrombotischen Prozesse speziell die Antithrombinverhältnisse des Blutes nach Heparinbelastung zu untersuchen. Dazu wurde ein von uns modifizierter Heparintoleranztest in vivo und in vitro herangezogen und die Antithrombinaktivität des Blutes (Citratvollblut - bzw. Plasma) mit der "Thrombinzeit" ermittelt. Als Vergleich dienten "gesunde" Versuchspersonen etwa der gleichen Altersklasse, die keine nachweisbaren Gefässobliterationen und keinen nachweisbaren pathologischen Organbefund aufwiesen.

Arteriosklerose

Unter einer Arteriosklerose verstehen wir einen herdförmigen Umbau der Gefässwand. Dieser spielt sich überwiegend in der Intima ab, wo er beginnt. Wir wissen aus Erfahrung, dass dieser Prozess bevorzugte Stellen hat, wie z.B. Gefässverzweigungen. Hier entwickeln sich erhabene, beetartige Stipchen, Flecken und Platten. Diese nennen wir arteriosklerotische Plaques. Diese Plaques sind zunächst weich und erfahren dann häufig Kalkeinlagerungen. Bevorzugt erkranken die Aorta, die grossen Stämme der Organarterien (Herz, Hirn) und die Arterien der Extremitäten. Unsere Patienten litten an Obliterationen der Bauchaorta und oder von Arterien der unteren Extremitäten.

Pathogenese

Bei der Entstehung eines arteriosklerotischen Plaques unterscheiden wir drei Stadien: Erstens, das initiale Intima-Ödem, das heisst initiale Verquellung. Zweitens, die Reparationsphase, die zeigt, dass das Irreparable geschädigte Gewebe durch eine komplexe Reaktion des verbleibenden noch funktionstüchtigen Gewebes beseitigt und soweit möglich durch Bindegewebe ersetzt wird.

Drittens die Phase der Sklerose oder das Narbenstadium in welcher Fibroblastenproliferation beginnt. Der Ersatz des zerstörten Gewebes erfolgt durch ein faserreiches neues Bindegewebe, das zunehmend schrumpft und derb ist. Bei der ersten Phase entwickelt sich in der Intima eine Verquellung der Grundsubstanz, die mit mehr oder weniger starker Schädigung des Gewebes einhergeht. Im Jahre 1852 bereits hat Rokitsansky angenommen, dass die Entstehung eines Atheroms zurückzuführen sei auf eine Organisation eines Thrombus, der sich mit der Intima vereint.

1856, vier Jahre nach Rokitsanskys Arbeit hat Virchow seine Theorie vorgestellt, dass Atherombildung verursacht wird durch Imbibition von Plasma in die schon zerstörte Intima mit der Folge, dass Lipide in der Grundsubstanz abgelagert werden. Diese Theorie lässt jedoch die folgenden Fragen offen:

1. Kommt die Intima-Degeneration vor oder nach der Imbibition von Plasma?
2. Ist ein erhöhter Blutlipoidspiegel ein prädisponierender Faktor beziehungsweise ein wichtiger Faktor?
3. Ist eine erhöhte Permeabilität des Endothels verursacht durch Allergien wie zum Beispiel Infektionskrankheiten, allergische Diathese, Tabakgenuss usw.
4. Welche Rolle spielen Nebenfaktoren wie z.B. Stress, Hypertension, Alter und vor allem Gerinnungsstörungen.

Duguid (8) hat die Vorstellung Rokitsanskys wieder aufgenommen und konnte zeigen, dass die Primärschädigung, also das erste Stadium in der pathogenetischen Kette verursacht ist durch Fibrinniederschläge an der Gefässinnenwand. Rotter und Mitarbeiter (25) führen die initiale Verquellung auf eine akute Ernährungsstörung der Gefässwand zurück. Der Grund für diese Vorstellung ist die in der Pathologie bekannte Tatsache, dass eine Hypoxydase mit einer Wasseraufnahme in dem Gewebe einhergeht. Diese Ernährungsstörung entsteht am wahrscheinlichsten, wenn man die Duguid'sche Theorie zugrundelegt, so dass die Hypoxydase sekundär auftritt nach den Fibrinniederschlägen in der Gefässinnenwand und dann erst die Ödembildung zustandekommt.

Ätiologie

Infolge der vielen Faktoren, die mitspielen in der Ätiologie einer Arteriosklerose, kann man nicht von einer einzigen Ursache sprechen. Einige dieser ätiologisch wirksamen Faktoren sind:

1. Alter:

Mit zunehmendem Alter tritt die Arteriosklerose häufiger und stärker auf und zwar nach dem 40. Lebensjahr bei Männern und bei Frauen im wesentlichen nach der Menopause.

2. Hormonale Beeinflussungen:

Es ist allgemein bekannt, dass Frauen erst nach der Menopause für Arteriosklerose anfällig sind. 1948 konnten Chaikoff (5) und Mitarbeiter eine Atheromatose in der Aorta des Vogels erzeugen bei Zugabe von Diethylstilbestrol. 1952 ist es Pick (22) und Mitarbeitern gelungen, eine Zurückbildung einer Coronar-Atheromatose bei cholesteringefütterten Kücken zu erreichen. Diese Autoren konnten eine Coronar-Atheromatose verhindern durch Zugabe von Oestrogenen bei cholesterin gefütterten Kücken. Vecciotti (34) konnte zeigen, dass die Follikelflüssigkeit der Frau einen heparinähnlichen Effekt hat. Es ist aus verschiedenen Untersuchungen abzuleiten, dass die Frauen vor der Menopause einen hormonalen Schutz haben gegen Atherosklerose.

3. Stoffwechsel:

Diabetiker neigen bekanntlich sehr zur Atherosklerose. Patienten mit Thyreotoxicosis scheinen nur selten zu erkranken, dagegen sollen Patienten mit Myxödem besonders anfällig sein. Gofman (9) fand eine signifikante Zunahme der - Lipoprotide mit der Ultrazentrifugierung bei Kranken mit überstandenen Herzinfarkten; somit scheinen Lipidstoffwechselstörungen auch eine wichtige Rolle zu spielen.

4. Hypertonie:

Nach Büchner, Rotter, Linzbach und W.W. Meyer (25) verursacht der Hochdruck sehr häufig eine Arteriosklerose bzw. eine bestehende Arteriosklerose verschlimmert sich und ihr Ablauf wird beschleunigt.

5. Exogene Naxen:

Gifte wie Nikotin, Blei, Alkohol und Bakterientoxine können hier als Faktoren erwähnt werden.

6. Körpergewicht:

Eine auch bekannte Tatsache ist, dass adipöse Leute früher und leichter erkranken, Zufuhr von tierischem Fett wird vor allem dafür verantwortlich gemacht.

7. Blutgerinnung und Arteriosklerose.

In neuerer Zeit wird vorwiegend aufgrund der schon erwähnten Duguid'schen Auffassung der Blutgerinnung bei Arteriosklerose immer mehr Beachtung geschenkt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob die Heparin Toleranz bei Patienten mit Atherosklerose gegenüber Gesunden verändert ist.

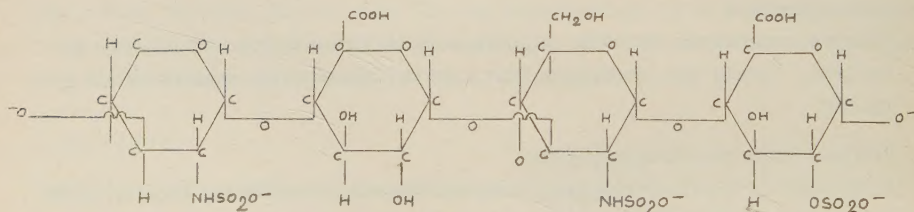
Heparin

Heparin ist ein Mucopolysaccharid. Es wurde 1916 von Mc Lean und Howel zuerst aus Leber isoliert. Es findet sich in den Mastzellen, die besonders zahlreich in Leber, Lunge und entlang der Blutgefäße vorkommen und wird wahrscheinlich dort gebildet.

Chemie

Jorpes und Mitarbeiter (19) erkannten das Heparin als einen Mucopolysaccharid-polyschwefelsäureester, bestehend aus 17,8 % Glucuronsäure, 17,8 % Glucosamin und Schwefelsäure mit einem Schwefelgehalt von 11,5 - 13,5 %. Nach Snellman (29) schwankt das Molekulargewicht zwischen 12000 und 16000. Die physiologische Aktivität hängt von der Zahl der Schwefelsäurereste ab, mit denen teils Alkoholgruppen von Glukose, teils NH_2 -Gruppen von Aminohexose verestert sind. Bei den am stärksten wirksamen Verbindungen findet man bis zu 3 SO_3 -Gruppen pro Hexose. Hoeuck (17) fand 1958, dass die Wirkung grösstenteils aus dem sauren Charakter eines hochmolekularen Poly-Anions zu erklären ist. Man kann daher die Heparineffekte durch Verbindungen imitieren, die durch Sulfurierung anderer Polysaccharide entstanden sind. Die genaue chemische Struktur des Heparins ist immer noch nicht ermittelt, aber es ist bekannt, dass es aus Glucosamin, Glucuronsäure und sulfonierten Ester-Gruppen besteht. Die wahrscheinlichste Struktur scheint nach Worfrom die wiederholende Tetrasaccharid-Einheit zu sein.

T A B E L L E 1



F. I Struktur Formel von Heparin, Molekulargewicht ist ca. 16000.

Biosynthese von Heparin:

Eiber und Danishefsky (10) fanden, dass radioaktives Heparin von Tieren isoliert werden konnte, denen radioaktive Glucose (C 14) kurz vorher gegeben wurde. Das zeigt, dass Glucose mitbeteiligt ist bei der Biosynthese von Heparin. In gleicher Weise wurde radioaktives Natriumsulfat (S 35) gegeben. Das Resultat war die Bildung von radioaktivem Heparin, enthaltend S 35. Daraus resultiert, dass auch Sulfat ein Baustein für die Heparinbiosynthese ist.

GERINNUNGSPHYSIOLOGIE.

Die Beeinflussung der Gerinnung durch Heparin ist eine mehrfache. Brinkhous (18) fand, dass Heparin die Bildung von Thrombin aus Prothrombin verhindert. Ausserdem ist es eine Anti-Thrombokinasase. Es kann als gesichert gelten, dass Heparin eine Antithrombinwirkung entfaltet. Nach Mellanby (18) soll Heparin in Gegenwart von Neutralsalzen direkt als Antithrombin wirken. Nach Quick (18) steigert es die normalerweise geringe Affinität von Thrombin zu dem im Blut vorhandenen Antithrombin. Snelman (28) gelang der Nachweis eines Komplexes aus Heparin einem Peptid mit 6 Aminosäuren und Lecithin, Cholesterin und Neutralfett in Blutmastzellen, welcher dem aktiven Antithrombin entsprechen dürfte. Burstein (4) fand, dass das Antithrombin mit den γ -2 Globulinen wandert. Daher tritt die paradoxe Erscheinung auf, dass bei Heparinzusatz das Thrombin zwar rascher, aber in kleinerer Menge inaktiviert wird. Die Cofaktoren beider Angriffspunkte des Heparins werden bei der Thrombinhemmung verbraucht. Nach Burstein (4) sollen beide Angriffspunkte des Heparins nur beim Thrombin liegen, das ja der wesentliche Faktor für die Aktivierung von Prothrombin ist und durch Thromboplastin nur verstärkt wird. Aber O'Brien (21) fand 1958, dass das Antihämophilieglobulin B (Christmas Faktor, Faktor IX) bei Menschen die Gerinnungshemmung durch Heparin aufhebt. Dieser Faktor ist an der Aktivierung des Thromboplastins massgeblich beteiligt.

Nach Fonio (12) hemmt Heparin auch die Retraktion des Gerinnsels und beschleunigt dessen Auflösung. Diese hängt aber von der Konzentration des Heparins ab, da Heparin in grösserer Menge die Fibrinolyse hemmt (Giacomazzi 13). Hahn (15) fand, dass das Heparin auch die Lipämie-Klärung im Plasma fördert. Beim Transport und Metabolismus von Lipoiden scheint es eine wichtige Rolle zu spielen. Es gibt viele Anhaltspunkte dafür, dass Heparin mitbeteiligt ist an der Aktivierung von Lipoprotein-Lipase, die einen Effekt auf die emulsionale Verarbeitung von aufgenommenen Fetten hat.

THERAPIE

Heparin wird schon seit einigen Jahren klinisch verwendet in der Behandlung von Thrombosen. Es ist ein "vielarmiger" Gerinnungshemmer und deshalb ist zu erwarten, dass es bei thromboembolischen Krankheiten nützlich ist. Die Wirkung des Heparins als Antikoagulanz ist fast schlagartig und infolgedessen ist es dort ausserordentlich wertvoll, wo rasches Handeln nötig ist. Heparin wirkt hauptsächlich in einem der späteren Stadien der Blutgerinnung: es hemmt die Bildung von Thrombin aus Prothrombin und damit auch die Umwandlungsgeschwindigkeit von Fibrinogen in Fibrin. Die pharmakologischen Effekte von Heparin beziehen sich also primär auf das strömende Blut; infolgedessen verhindert Heparin nicht die Prothrombinsynthese in der Leber, wie es der Fall bei den Kumarin-Derivaten ist. Heparin hat keine wesentliche Wirkung auf Blutdruck, Körpertemperatur, Respiration oder Leberfunktion. Obwohl Heparin die Gerinnungszeit des Blutes verlängert, hat es keinen Effekt auf die Blutungszeit und deshalb kann man es verwenden, wo chirurgische Eingriffe nötig sind. Zur Behandlung von Thrombosen hat Heparin eine grosse Bedeutung erlangt. Bei frischem Herzinfarkt und akuten embolischen Ereignissen werden 3-4 mal täglich 15000 bis 25000 Einheiten intravenös oder zusammen mit der Dauerinfusion von ATP intraarteriell injiziert. Die Heparinbehandlung wird bis zum Wirksamwerden der gleichzeitig einsetzenden Verabreichung von Kumارين fortgesetzt. Kontraindikationen einer Heparintherapie sind:

1. Hämorrhagische Diathesen jeder Form
2. Magen-Darmulzera
3. Bakterielle Endocarditiden
4. Unmittelbar bevorstehende Operationen
5. Drohende intrakranielle Blutungen
6. Maligne Hypertonien.

HEPARINTOLERANZTESTE IN VIVO UND IN VITRO.

Die folgende Aufstellung zeigt die verschiedenen Heparintoleranzteste in vivo und in vitro, die in der Literatur zu finden sind. Bei unseren Untersuchungen haben wir versucht, eine neue Methode zu finden, die einfach ist. Es ist uns auch gelungen, viele Fehlerquellen die in den nachstehenden Methoden aufgezeichnet sind, zu verringern.

A. IN VIVO-METHODEN

De Takats-Test (7)

Prinzip:

Es werden 10 mg Heparin i. v. gespritzt und 10 Minuten später in regelmässigen zeitlichen Abständen (ca. 10 Minuten) Blut aus der Fingerbeere in eine Kapillare aufgesogen und alle 20 Sek. ein Stückchen abgebrochen, bis der erste Fibrinfaden erscheint.

Ergebnisse:

Aus den Gerinnungszeiten lässt sich eine Kurve aufstellen, die bei Heparinresistenz (Hyporeaktoren) flach verläuft. Eine solche Resistenz wurde bei Thrombosen, Arteriosklerose, Endangiitis obliterans und nach Operationen festgestellt.

Kritik:

Zimmertemperatur! Verwendung von Kapillarblut ist mit Fehlern verbunden.

Koller-Toleranztest (20a, 20b).

Prinzip:

I. V. Injektion von 40 mg Heparin und Blutentnahme 30 Minuten, 1, 2 und 3 Stunden später. Das Blut wird in siliconisierten Röhrchen im Verhältnis 9:1 mit Oxalat gemischt und zentrifugiert. 0,2 ccm des Plasmas werden mit 0,1 ccm Thrombinlösung versetzt und die Gerinnungszeit bei 30° gemessen.

Ergebnisse:

Verkürzte Gerinnungszeiten (Heparinresistenz) wurden beobachtet bei Pleuritis exsudativa, Pneumonien, Thrombosen, Myocardinfarkt und postoperativ.

Kritik:

Das Arbeiten mit Plasma und die verschiedenen Blutentnahmen machen die Methode zeitraubend.

Koller-Toleranztest, modifiziert nach Bally (1).

Prinzip:

Versetzen von 1 ccm Venenblut (ohne Oxalat) in siliconisierten Röhrchen mit einem Normaltropfen Standardthrombinlösung und Bestimmung der Gerinnungszeit bei Zimmertemperatur. Blutentnahme vor und 10 Minuten nach i. v. Injektion von 5000 Einheiten Heparin.

Ergebnisse:

Bestätigung der Heparinresistenz bei frischen Thrombosen und Embolien, sowie bei Polyarthrits rheumatica. Auf Grund dieses Testes soll die therapeutische Heparindosis bestimmt werden.

Kritik:

Das Arbeiten mit Tropfen und bei Zimmertemperatur bringt immer eine Reihe von Unsicherheiten mit sich.

Test nach Hagedorn & Barker (14)**Prinzip:**

Es wird die Spontangerinnungszeit von Venenblut nach der Lee-White-Technik gemessen und zwar unmittelbar vor und 10 Minuten nach i. v. Injektion von 25 mg Heparin. Zimmertemperatur.

Ergebnisse:

Bei Thrombosepatienten wurden besonders viel Hyporeaktoren beobachtet.

Kritik:

Zimmertemperatur. Die Methode ist zeitraubend.

B. IN VITRO-METHODEN**Waugh-Ruddick-Test (36)****Prinzip:**

In 7 Wassermann-Röhrchen gibt man je 0,5 ccm einer Lösung steigender Mengen Heparin in physiologischer Kochsalzlösung. Die einzelnen Röhrchen enthalten 1/10, 2/10 bis 7/10 I.E. Heparin. In jedes Röhrchen gibt man 1 ccm frisches Venenblut und notiert die Spontangerinnungszeit nach der Technik von Lee-White. Es wird bei Zimmertemperatur gearbeitet.

Ergebnisse:

Die Gerinnungszeit beträgt bei Normalblut 18 Minuten $\pm$ 8 Minuten mit 1/10 I.E. Heparin und steigt mit 7/10 I.E. auf 75 Minuten $\pm$ 10 Minuten. Bei Zusatz von Thromboplastin, bei mehrtägiger Bettruhe (Thromboseneigung) sowie postoperativ ist die Gerinnungszeit verkürzt. Eine besonders ausgeprägte Hyperkoagulabilität wird nach grossen Aderlässen beobachtet. Bei plättchenarmen Plasma ist die Gerinnungszeit verlängert.

Kritik:

Zeit und Arbeitsaufwand sowie die benötigten Blutmengen sind recht gross. Zimmertemperatur.

Modifizierter Waugh-Ruddick-Test nach Silverman (36).

Prinzip:

In 7 Wassermann-Röhrchen (13 x 100 mm, Wasserbad 37,5°) gibt man 0,2 ccm m/100 Chlorcalciumlösung und fügt dazu je 0,1 ccm steigender Mengen Heparin in physiologischer Kochsalzlösung, nämlich 1/50, 2/50 bis 7/50 I.E. Dazu gibt man 0,1 ccm Oxalatplasma (Blut 5 Minuten bei 1000 Touren zentrifugiert) und misst die Gerinnungszeit in üblicher Weise.

Ergebnisse:

Unter Verwendung von Normalblut betragen die Gerinnungszeiten 5 Minuten bei 1/50 I.E. Heparin und steigen auf 45 Minuten bei 7/50 I.E. Heparin. Postoperativ wurde fast durchwegs eine Verkürzung der Gerinnungszeiten beobachtet.

Kritik:

Arbeitsaufwand ist recht gross. Die Methode besitzt den Vorteil, dass man mit weniger Blut auskommt und die Gerinnungszeiten kürzer sind als nach der Originalmethode. Durch die Verwendung von Plasma anstelle von Vollblut ist jedoch ein neuer Unsicherheitsfaktor entstanden (Plättchen!).

Toleranztest nach Rosenbaum und Barker (24).

Prinzip:

Man lässt 1 ccm Venenblut mit 1 ccm einer Heparinlösung (0,006 mg = ca. 0,6 I.E.) in einem Koagulometer mit photoelektrischer Ablesung gerinnen (37°).

Ergebnisse:

Normalgerinnungszeit = 30 Minuten. Bei Thrombosepatienten wurden in ca. 50 % der Fälle Werte unter 30 Minuten beobachtet.

Kritik:

Teure Apparatur. Vorteil: Nur eine Heparinkonzentration.

Heparin-Toleranztest nach Soulier (30).

Prinzip:

Es wird bei 37° die Recalcifizierungszeit von Oxalatplasma (Blut 5 Minuten bei 2600 T. zentrifugiert) in Gegenwart steigender Mengen Heparin bestimmt. 4 x 0,5 ccm Plasma werden mit je 0,5 ccm Calciumchloridlösung versetzt, welche 0, 0,3, 0,7 und 1 I.E. Heparin enthalten.

Ergebnisse:

Gemäss dieser Technik erhält man Normalwerte von 2,31 sec., 4 Minuten, 7 Minuten und 12 Minuten. Der neue Test wird von Soulier zur Kontrolle der Dicoumarol-

therapie vorgeschlagen, da damit eine Hypo- oder Hypokoagulabilität des Blutes viel eher erkannt werden könne als mit der üblichen Prothrombinzeitbestimmung. Der therapeutische Wert ist bei der Cumarintherapie dann erreicht, wenn eine Verdoppelung der Normalgerinnungszeit beobachtet wird.

Kritik:

Durch die Verwendung von Plasma ist eine Bestimmung direkt am Krankenbett unmöglich. Die Fehlerbreite ist besonders bei den höheren Heparinkonzentrationen noch sehr gross.

Toleranztest nach Soulier modifiziert nach Sigg (28).

Prinzip:

In 4 Röhrchen mit je 0,2 ccm/^m40 Chlorcalciumlösung enthaltend 0, 0,3, 0,5 und 0,6 I.E. Heparin gibt man 0,2 ccm Oxalatplasma (Blut 15 Minuten zentrifugiert bei 1500 T.) und bestimmt die Gerinnungszeit.

Ergebnisse:

Normalwerte: Mit 0,3 I.E. Heparin = 5 Minuten, mit 0,5 I.E. = 7 Minuten mit 0,6 I.E. = 10 Minuten. Der Test soll der Prothrombinzeitbestimmung bei der Dicumaroltherapie überlegen sein, indem sowohl eine Hypercoagulabilität (Thrombosegefahr) als auch eine Hypocoagulabilität (Blutungsgefahr) zuverlässig erkannt werden.

Kritik:

Als Krankenbett-Methode ungeeignet, da mit Plasma gearbeitet wird.

De Takats Sensitized Clotting Time (7).

Prinzip:

1 ccm Venenblut wird mit 0,1 ccm einer Lösung von 4 gamma = ca. 0,4 I.E. Heparin in physiologischer Kochsalzlösung gemischt und die Gerinnungszeit nach der Lee-White-Technik bestimmt. 37°.

Ergebnisse:

Normalblut gerinnt bei 22-28 Minuten. Bei akuter Thrombophlebitis ist die Gerinnungszeit verkürzt. Verlängerte Gerinnungszeiten wurden beobachtet nach massiven Blutungen und Cumarin-Verabreichung. Der Test scheint wertvolle Aufschlüsse zu geben bei der Kontrolle der Cumarintherapie.

Kritik:

Durch die Verwendung von nur einer Heparinkonzentration ist die Technik zwar sehr vereinfacht, wegen der langen Gerinnungszeiten aber noch recht zeitraubend.

Mikroheparintest nach Sigg (26).

Prinzip:

0,5 ccm Oxalatblut aus Schnepferstich in die Fingerbeere werden bei 37° mit 0,15 ccm ^m/40 Calciumchloridlösung enthaltend 0,75 I.E. Heparin versetzt und die Gerinnungszeit gemessen.

Ergebnisse:

Normalwert 9-13 Minuten, Werte unter 7 Minuten bedeuten erhöhte Gerinnungstendenz. Solche Werte wurden post op. und post part. beobachtet. Der Test soll sich auch zur Kontrolle der Cumarinmedikation eignen.

Kritik:

Die Verwendung von Kapillarblut scheint wegen der Gewebsthrombokinase beim Heparintoleranztest sehr riskant.

Hirudin-Toleranztest nach Bay (2)

Prinzip:

Hirudin wird in 3 Konzentrationen (1/8, 1/6 und 1/4 Verdünnung) in einer Lösung von 1,11 g Chlorcalcium in 400 ccm Wasser gelöst und je 0,5 ccm dieser Lösung mit 0,5 ccm Plasma (zentrifugieren von Blut während 3 Minuten bei 2600 T.) vermischt. Gerinnungsbestimmung bei 37°.

Ergebnisse:

Der Gerinnungseintritt soll mit Hirudin besonders leicht zu beobachten sein. Der Test soll empfindlicher sein als der Toleranztest nach Soulier.

Kritik:

Irgendwelche Erfahrungen von anderen Autoren liegen noch nicht vor, so dass kein abschliessendes Urteil gefällt werden kann. Wenn der Gerinnungseintritt bei Gegenwart von Hirudin besser festgestellt werden kann als bei Gegenwart von Heparin, wäre das ein sehr grosser Fortschritt.

Wir haben eine Modifikation der Koller-Methode (20b) ausgearbeitet, die uns folgende Vorteile verspricht:

1. Arbeiten am thrombocytenarmen Citratplasma
2. 37°C (in vivo Temperatur)
3. Exakte Erfassung des Gerinnungseintrittes durch die Platinösenrührmethode mit Beleuchtung der verwendeten Gläschen in 2 Ebenen im Wasserbad,
4. Verwendung genau definierter Blutmengen im Gegensatz zur Kapillarblutmethode. Keine Voraktivierung des Gerinnungssystems durch Gewebs-Thromboplastin.
5. Exaktere Erfassung von Unterschieden in der Heparin-Toleranz zwischen gesunden Vergleichspersonen und Patienten durch Verwendung besonders kleiner Heparinmengen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Heparintoleranztest in vivo

Material

- 1) Test-Thrombin (Trockensubstanz Behringwerke, ⁶⁰NIH)
- 2) Spezialanfertigung einer Liquemin-Verdünnung (NaCl), die 103,5 IE Heparin in 1 ml enthält
- 3) Standard-Normalplasma als Trockensubstanz (SNP-"Dade" Reag. Inc.)
- 4) Aqua bidest Ampullen
- 5) Na-Citratlösung 3,8 %
- 6) Reagenzgläser 10 ml und 1 ml
- 7) Pipetten
- 8) Zentrifuge
- 9) Stoppuhr
- 10) Gerinnungsthermostat nach J. Jürgens und Beller
- 11) Platinösen

Ansetzen der Testlösungen

1 Ampulle Test-Thrombin Trockensubstanz wird in 10 ml Aqua-Bi-Dest (6 NIH-Einheiten / ml) gelöst und nach 30 Minuten verwendet. Die Lösung ist 2-3 Stunden haltbar.

Standard-Normalplasma wurde aufgelöst in 1 ml Aqua bidest.

Methodik:

a) Blutabnahmen und Heparin-Injektion.

Wir haben 20 ml Citratblut 1:10 mit allen Kautelen bei nüchternen Patienten und gesunden Vergleichspersonen abgenommen, danach wurde 5,0 ml Heparin injiziert. (5,0 ml enthalten 520 I.E. Heparin, entsprechend 5 mg Heparin). Injektionsdauer 10 sec. Nach genau 8 Minuten haben wir aus der anderen Cubital-Vene nochmals 20 ml 1:10 Citratblut abgenommen. Das Blut wurde langsam und vorsichtig ohne Schaumbildung in ein Reagenzglas gegeben und sofort 7 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert.

b) Thrombinzeit-Bestimmung (nach Quick) (23)

Von diesem Plasma haben wir 0,2 ml 1 Minute bei 37° im Thermostaten vorgewärmt und dann dazu 0,1 ml Test-Thrombinlösung gegeben.

Zur selben Zeit wurde die Stoppuhr in Bewegung gesetzt, der Ansatz mit einer Platinöse gut durchgemischt und beim ersten nachweisbaren Fibrinfädchen abgestoppt. Von jeder Blutprobe wurden mindestens 4 Bestimmungen gemacht. Der

Nullwert wurde genauso ermittelt unter Verwendung von SNP (Standard-Normal-plasma). Wir haben bei einer grösseren Anzahl von Patienten dieser in Vivo-Methode im gleichen Arbeitsgang eine in Vitro-Methode gegenübergestellt und hierbei Citratblut verwendet.

Heparintoleranztest in Vitro

Material:

- 1) Trocken-Substanz-Reagens für Heparintoleranztest der Fa. Hoffmann-La Roche (10 IE Heparin /ml)
- 2) Gerinnungsthermostat nach J. Jürgens und Beller
- 3) Test-Thrombin Trockensubstanz Behringwerke 60 NIH
- 4) Platinösen
- 5) Aqua Bi-Dest-Ampullen
- 6) Pipetten
- 7) Reagenzgläser 10 ml und 1 ml
- 8) Citratlösung 3,8 %.

Ansetzen der Testlösungen

1. 1 Ampulle Test-Thrombin Trockensubstanz in 10 ml Aquabidest lösen und nach 30 Minuten verwenden.

2. Zu der Heparin Trocken-Substanz wird genau 5 ml Aqua-Bi-Dest dazugegeben und gut durchgeschüttelt, bis vollständige Lösung erfolgt ist. 1 ml von der Stammlösung wird abpipettiert und in ein 10 ml Reagenzglas gegeben, in dem schon 9 ml Aqua bidest enthalten sind. Dadurch entsteht eine 1:10 Heparin Toleranztest-Lösung (1 IE/ml). Davon wird eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt und die Verdünnungen 1:20 und 1:40 werden dann verwendet (enthalten 0,5 bzw. 0,25 IE/ml).

Methodik

Wir entnehmen 10 ml Citratblut (1:10) von nüchternen Patienten und gesunden Vergleichspersonen. Von diesem Blut haben wir 0,4 ml abpipettiert in kleine Reagenzgläser. Jede Blutprobe wurde 1 Min. vorgewärmt bei 37° konstanter Temperatur im Wasserbad. Von den beiden Heparin-Verdünnungen (0,25 und 0,50 IE/ml) wurden dann jeweils 0,2 ml der vorgewärmten Blutprobe zugegeben, gut durchmischt und wieder 1 Min. im Wasserbad vorgewärmt. Daraufhin gaben wir 0,2 ml Testthrombin-Lösung (enthaltend 1,2 NIH) dazu unter Ingangsetzung der Stoppuhr und unter gleichmässigem Umrühren mit einer Platinöse. Sobald das erste Fibrinfädchen sichtbar war, haben wir abgestoppt. Wir haben von jeder Blutprobe 4 Bestimmungen mit einer Heparin-Lösung von 0,5 IE und 0,25 IE vorgenommen und

3 Nullwerte mit Aqua-bidest anstatt Heparinlösung gemacht. Wir haben auch physiol. NaCl-Lösung für die Nullwerte verwendet, um Hämolyseeffekte zu prüfen, jedoch keinen Unterschied gefunden.

ERGEBNISSE:

I. Heparintoleranztest in vivo.

Es wurden untersucht: 54 Patienten (P) mit gesicherter obliterierender Arteriopathie (Oszillogramm, Arterio- bzw. Aortogramm) der unteren Extremitäten, 24 "gesunde" männliche (MV) und 42 "gesunde" weibliche (wV) Vergleichspersonen, die keine obliterierende Arteriopathie und keinen sonstigen nachweisbaren pathologischen Organbefund aufwiesen. Die mit der Thrombinzeit erhaltenen Werte sind, auf den jeweiligen Nullwert vor der Heparininjektion prozentualisiert, in Abb. 1 dargestellt. Dabei entspricht jeder eingetragene Punkt dem Mittelwert aus mindestens 4 Einzelbestimmungen.

In Abb. 2 sind diese Mittelwerte, dargestellt in Sekunden, vor und nach Heparininjektion zusammengefasst, und die einzelnen Untersuchungsgruppen nochmals einander gegenübergestellt. Dabei ergab ein Vergleich der Mittelwerte vor Heparin-gabe keinen statistisch zu sichernden Unterschied zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen untereinander, während nach Heparininjektion der Unterschied zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen statistisch gesichert werden konnte.

Eine Aufgliederung der drei Gruppen in ansteigende Verlängerungen der Thrombinzeit nach Heparininjektion ergab folgende Verteilung:

T A B E L L E

Verlängerungen sec	K	mV	wV
bis 4	16 (8.55)	2 (3.80)	1 (6.65)
5-8	17 (10.35)	1 (4.60)	5 (8.05)
9-12	13 (8.10)	3 (3.60)	2 (6.30)
13-16	8 (9.90)	7 (4.40)	7 (7.70)
über 16-100	0 (17.10)	11 (7.60)	27 (13.30)
Gesamtzahl der Versuchspersonen	54	24	42

Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den theoretischen Erwartungswerten bei einer Normalverteilung der drei Gruppen.

Das deutliche Defizit der Patientengruppe P bei den hohen Zeiten einerseits und der deutliche Überschuss der beiden anderen Vergleichsgruppen bei diesen Zeiten zeigt, dass die Verlängerung der Thrombinzeit nach Heparininjektion bei den Patienten mit obliterierender Arteriopathie wesentlich kleiner ist als bei den Vergleichspersonen. Mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests konnte dieser Unterschied in den Verteilungen der einzelnen Gruppen statistisch hoch gesichert werden ($n = 8$; $\chi^2_{\text{emp.}} = 61,087$; $p < 0,01 \%$) (35).

II. Heparintoleranztest in vitro.

In Ergänzung zu den in «vivo» Heparinbelastungen wurde bei einem Teil der Versuchspersonen die Heparintoleranz in vitro nach Zusatz von 0,25 IE Heparin bzw. 0,5 IE Heparin (1:40 bzw. 1:20-Verdünnung des Heparintoleranztest-Reagens «Roche») am Vollcitratblut bestimmt.

Die Abb. 3 zeigt die wieder auf den Thrombinzeitausgangswert vor Heparinzusatz prozentualisierten Mittelwert nach Heparinzusatz (0,25 IE/ml). Es wurden untersucht:

19 Patienten mit obliterierender Arteriopathie, 14 «gesunde» männliche und 16 «gesunde» weibliche Vergleichspersonen. In der Abb. 4 sind die Ergebnisse bei denselben Versuchspersonen nach Heparinzusatz 0,5 IE/ml dargestellt. Bei gleich-grosser Patientenzahl kamen hier 12 «gesunde» männliche und 15 «gesunde» weibliche Vergleichspersonen zur Untersuchung.

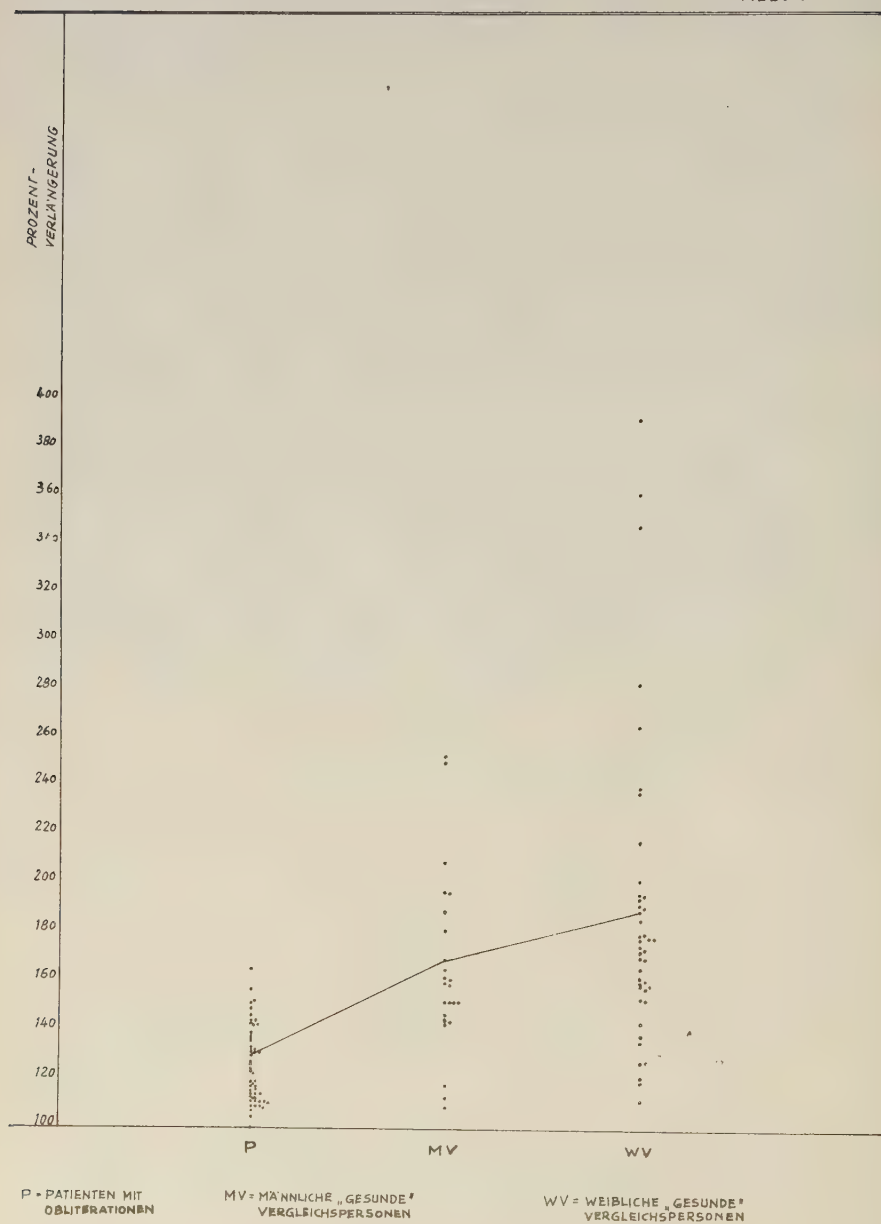
Auch in den Abb. 3 und 4 zeigt sich beim Vergleich mit den Ergebnissen des in-vivo-Heparintoleranztests (Abb. 1 und 2) ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den Patienten und den Vergleichspersonen (auf eine statistische Auswertung wurde hier verzichtet.)

Die Abb. 5 bringt nochmals einen Gesamtvergleich der Ergebnisse des in-vitro-Tests, hier in derselben Darstellungsweise wie in Abb. 2.

HEPARIN TOLERANZTEST IN VIVO

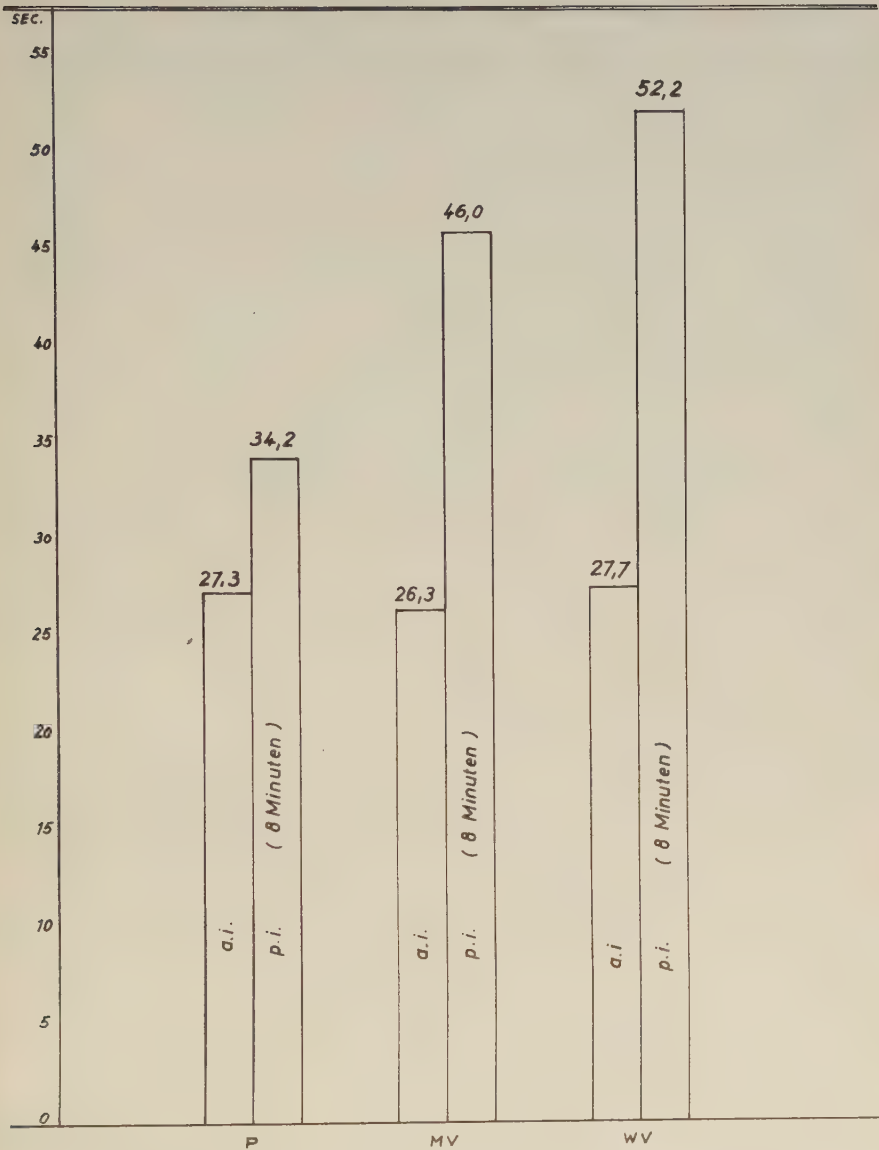
INJEKTION VON 520 I.E. HEPARIN (5mg HEPARIN)

Abb. 1



MITTELWERTE DER THROMBINZEIT IN SEKUNDEN
VOR UND NACH INJEKTION VON 520 JE.(5mg) HEPARIN

Abb.2



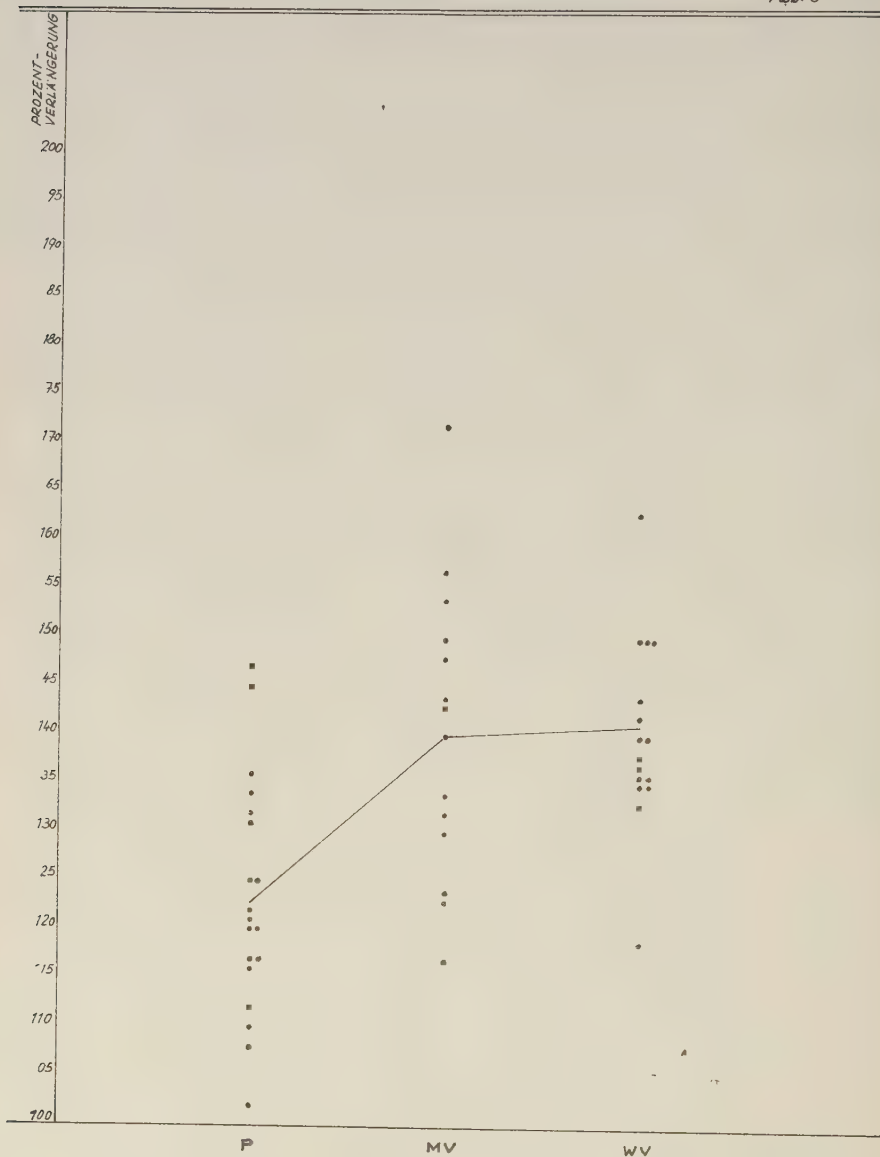
P = PATIENTEN MIT OBLITERATIONEN

MV = MÄNNLICHE „GESUNDE“
VERGLEICHSPERSONENWV = WEIBLICHE „GESUNDE“
VERGLEICHSPERSONEN

HEPARIN TOLERANZTEST IN VITRO

HEPARIN 1:40 (0,25 I.E./ML)

Abb. 3



P = PATIENTEN

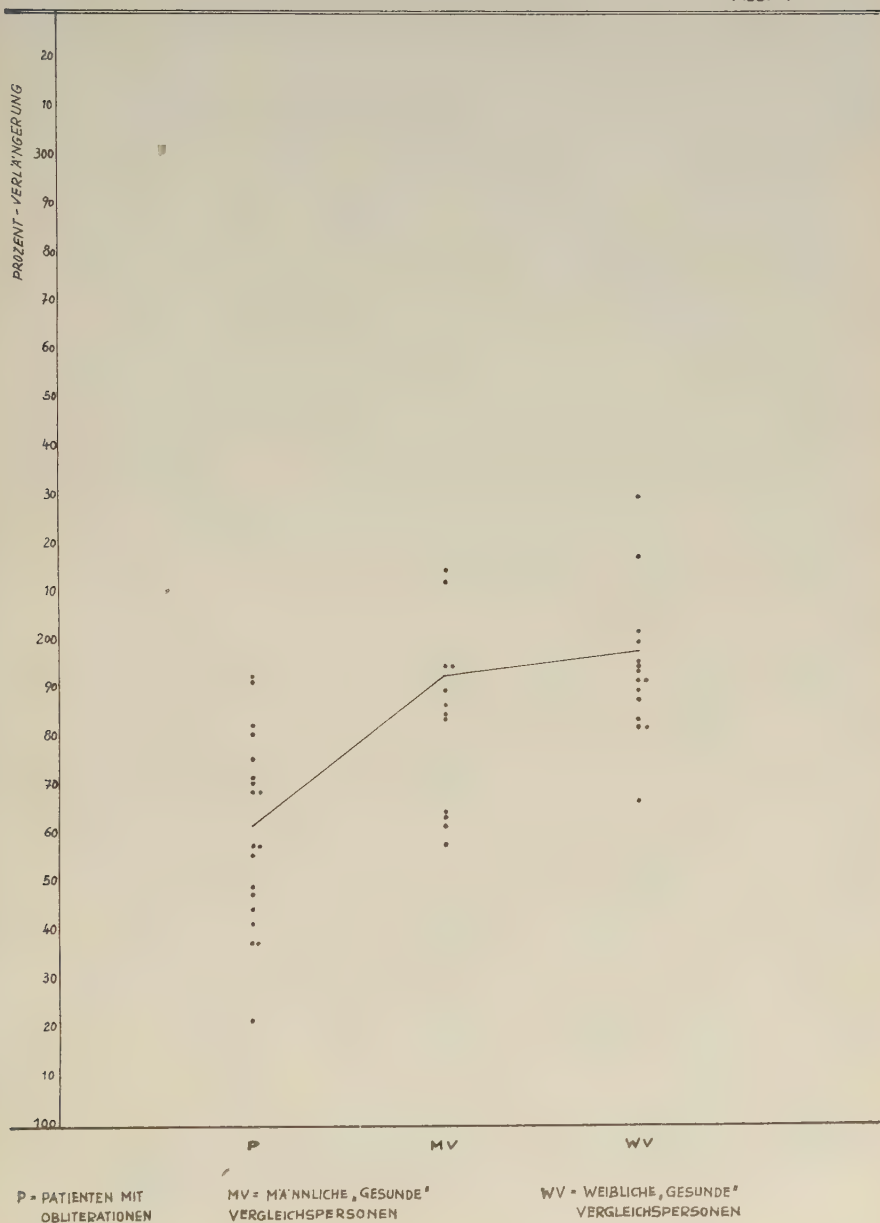
MV = MÄNNLICHE „GESUNDE“ VERGLEICHSPERSONEN

WV = WEIBL. „GESUNDE“ VERGLEICHSPERSONEN

HEPARIN TOLERANZTEST IN VITRO

HEPARIN 1:20 (0,5 I.E./ML)

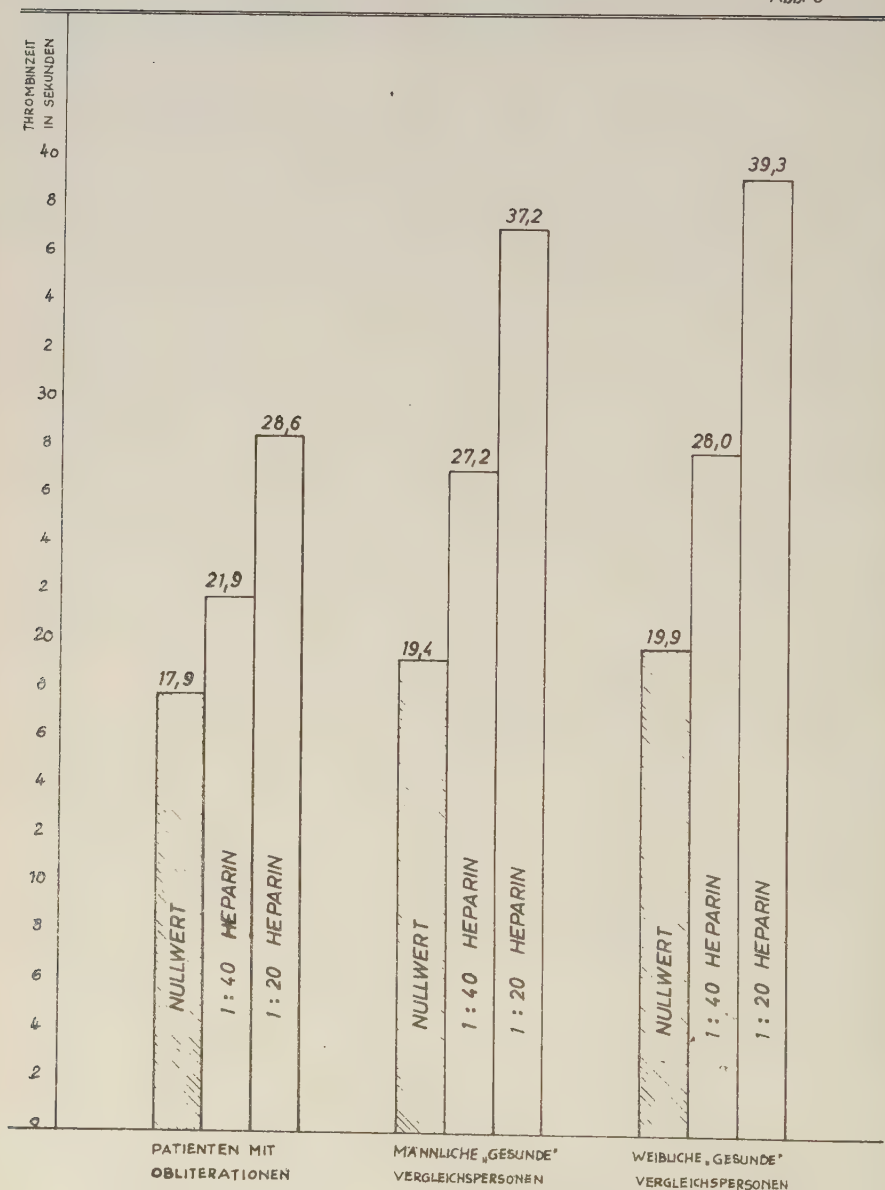
Abb. 4



HEPARIN TOLERANZTEST IN VITRO

MITTELWERTE DER THROMBINZEIT IN SEKUNDEN

Abb. 5



DISKUSSION DER ERGEBNISSE:

Bei der Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder mit dem Heparin-Toleranztest hat man verschiedene Reaktionstypen feststellen können. Abgesehen von einem gegenüber der Norm nicht abweichenden Verhalten wurde eine erhöhte Heparintoleranz beim Myocardinfarkt, bei Thrombophlebitis, bei der Pneumonie, Tuberkulose und beim Rheumatismus, eine herabgesetzte Heparintoleranz bei Lebercirrhose, Uterusblutungen, bei essentieller Hyperheparinämie, bei hämorrhagischen Diathesen sowie bei Leukämien festgestellt. Diese recht heterogenen Krankheitsbilder können jedoch, wenn auch mit Einschränkungen, gerinnungsphysiologisch einerseits mit einer Neigung zur Hyperkoagulämie, andererseits zur Hypokoagulämie in Beziehung gebracht werden. Als primäre Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte bzw. herabgesetzte Heparintoleranz kann daher wohl das Vorliegen einer Korrelationsstörung des labilen Gleichgewichts zwischen gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Faktoren angenommen werden.

Eine so nichts präjudizierende Bewertung eines pathologischen Ausfalls der Heparintoleranz erscheint zweckmässig, da bekannt ist, dass der Test durch die Konzentration von Prothrombin, Faktor VII und antihämophilem Globulin, sowie ausserdem durch die Thrombocytenzahl beeinflusst werden kann. Diese Einschränkungen würden zwar der oben gemachten Einteilung in Hyper- und Hypokoagulämie in etwa entsprechen, jedoch nicht den zunächst naheliegenden Schluss auf eine tatsächlich vorhandene Verminderung oder Vermehrung des in der Blutbahn zirkulierenden endogenen Heparins gestatten.

Der von uns modifizierte Heparintoleranztest nach Koller (20 a) besitzt nun den grossen Vorzug, dass die Aktivität des zugesetzten Heparins mit Thrombinzusatz ermittelt wird. Dabei wird das Heparin als das sofort wirksame Antithrombin II in der 2. Gerinnungsphase bestimmt, wobei die sonstigen gerinnungshemmenden Wirkungen des Heparins als vielarmiger Hemmer der Vorphase und der 1. Gerinnungsphase praktisch nicht störend in die Reaktion eingehen können.

Umgekehrt kann dabei auch die Heparinwirkung auf das zugesetzte Thrombin nicht durch Störungen in der Vorphase und 1. Gerinnungsphase, sondern nur durch grössere Unterschiede in der Thrombocytenzahl (Thrombocytenfaktor 4 als Heparinhemmer) und in der Fibrinogenkonzentration beeinflusst werden, was in unserer Fragestellung erwünscht ist.

Die sonst meist mit "globalen" Gerinnungstesten wie Recalcifizierungszeit, Thrombelastographie oder Lee-White-Methode gemessene Heparintoleranz erfasst demgegenüber die ganze Komplexität des Gerinnungsablaufs, ohne Einzelreaktionen beurteilen zu können; dies ist natürlich, besonders zur klinischen Beurteilung z.B. von "latenten" Hyper- oder Hypokoagulämien bei der Antikoagulantientherapie, bei anderen Fragestellungen von Wichtigkeit.

Es wurde bisher nur von relativ wenigen Autoren (35) die Heparintoleranz bei arteriosklerotischen Gefässprozessen und deren Komplikationen untersucht. In Vordergrund des Interesses stand dabei der Myocardinfarkt, wobei zwar im Allgemeinen eine erhöhte Heparintoleranz gefunden wurde, Diskrepanzen bei einigen Untersuchern aber dadurch zustandekommen, dass der Zeitpunkt der Untersuchung beim Myocardinfarkt eine grosse Rolle spielt. Dies wurde bei einer Reihe von Arbeiten nicht genau deklariert. Untersuchungen von Patienten mit gesicherter arterieller Obliteration der unteren Extremitäten mit dem Heparintoleranztest wurden bisher kaum gemacht, und dann auch mit teilweise wenig spezifischen "globalen" Gerinnungsmethoden (6, 20b, 24). Auch war die untersuchte Fallzahl für eine Beurteilung nicht ausreichend.

Die von uns bei dieser Patientengruppe ermittelte erhöhte Heparintoleranz stimmt mit den Ergebnissen dieser Untersucher, soweit vergleichbar, überein. Ein grosser Vorteil unseres herangezogenen Krankengutes ist im Vergleich zu Untersuchungen beim Myocardinfarkt seine Homogenität:

es handelt sich hier um keine akuten Verschlüsse, sondern bei der grössten Zahl der Patienten bestanden die nachgewiesenen Verschlüsse schon eine längere Zeit. Daher können die Ergebnisse dieser Untersuchungen recht gut miteinander verglichen werden. Auffallend ist, dass bei den untersuchten "gesunden" männlichen und weiblichen Vergleichspersonen die Unterschiede der Einzelergebnisse untereinander viel grösser sind als bei den Obliterationen (Abb. 1), merkwürdigerweise jedoch nur bei der in-vivo-Toleranz. Diese grössere Streuung der Werte ist am ehesten dadurch erklärlich, dass unter den "gesunden" Vergleichspersonen sicher eine Anzahl von Personen bereits arteriosklerotische Gefässveränderungen aufweisen, die sich jedoch klinisch oder arteriographisch noch dem Nachweis entziehen. Die höchsten Verlängerungen nach Heparinbelastung fanden wir bei jungen Frauen zwischen 17 und 25 Jahren, wobei keine Abhängigkeit vom Menstruationscyclus nachweisbar war. Die geringste Ansprechbarkeit war bei Frauen einige Jahre nach der Menopause erkennbar, wobei jedoch kein scharfer Knick der Alterskurve durch die Klimax bestand.

Die prinzipielle Übereinstimmung der Heparintoleranzen in vivo und in vitro lässt den Schluss zu, dass das injizierte Heparin in 8 Minuten weder nennenswert abgebaut oder ausgeschieden wird, noch dass der Organismus in dieser Zeit nachweisbare Gegenregulationen veranlasst. Ein weiterer Hinweis für diese Annahmen besteht darin, dass die in-vitro verwendeten Heparinmengen grössenordnungsmässig beim Vergleich mit den injizierten Heparinmengen verblüffend gut übereinstimmen, und dabei zu etwa gleichen Gerinnungszeitverlängerungen führen. Folgende Vergleichszahlen mögen das demonstrieren:

In vitro: 0,25 bzw. 0,5 IE Heparin in 1 ml Heparinverdünnung, davon im Ansatz auf 0,4 ml Citratvollblut 0,2 ml dieser Heparinverdünnung = 0,05 IE bzw. 0,1 IE Heparin.

In vivo: 500 IE Heparininjektion, die auf ca. 5000 ml Blut kommen. Umgerechnet sind dann in 1 ml des abgenommenen Vollcitratblutes 0,1 IE bzw. im abzentrifugierten Citratplasma ca. 0,2 IE Heparin, im Gerinnungsansatz (0,2 ml Citratplasma) somit 0,04 IE Heparin. Die in vitro genau dosierten Heparinmengen stimmen also mit den in vivo errechneten bemerkenswert gut überein. Die mit beiden Methoden erzielten Gerinnungszeitverlängerungen sind, besonders bei Betrachtung der Patientenwerte, ebenfalls in etwa derselben Grössenordnung (vergl. Abb. 1, 3 und 4).

Die Ursache (n) für die nachgewiesene signifikant erhöhte Heparintoleranz der Patienten mit obliterierender Arteriopathie konnte (n) im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Befunde auf morphologischem und biochemischem Gebiet können jedoch zur Erklärung herangezogen werden; bei arteriosklerotisch veränderten Gefässen sind die paravasalen Gewebsmastzellen deutlich vermindert, und die Klärfähigkeit lipämischen Plasmas durch Heparin ist ebenfalls bei arteriosklerotischen Veränderungen deutlich vermindert. Alle diese Befunde sprechen für eine Senkung von heparinoiden Substanzen im Blut bei Arteriosklerose. Chemisch sind die meisten dieser heparinoiden Substanzen saure Polysaccaride und schliessen, ausser dem Heparin selbst, phosphorhaltige mit Säuren fällbare Mukoproteidfraktionen im Plasma ein. Quantitative Untersuchungen über Heparin (oide) im strömenden Blut zeigen, je nach verwendeter Methodik, bei den verschiedenen Autoren ganz erhebliche Unterschiede, so dass hier auf keine exakten Zahlen zurückgegriffen werden kann. Deshalb ist man immer noch auf indirekte Nachweismethoden angewiesen, wie z.B. Metrachromasie, Protaminbindung oder Gerinnungsaktivität bzw. Kläraktivität. Dazu konnte die vorliegende Arbeit einen Beitrag liefern.

Z U S A M M E N F A S S U N G:

1. An Hand einer Literaturübersicht wurden pathogenetische und ätiologische Faktoren der Arteriosklerose kurz dargestellt.
2. Eigenschaften und Wirkungen des Heparins wurden unter besonderer Berücksichtigung seiner blutgerinnungshemmenden Effekte besprochen und die bisher in der Literatur angegebenen Heparintoleranzteste in vivo und in vitro dargestellt.
3. In eigenen Untersuchungen wurde ein von Koller angegebener Heparintoleranztest in vivo von uns modifiziert und mit einem von uns entwickelten Heparintoleranztest in vitro verglichen. Zur Untersuchung kamen Patienten mit gesicherter (Oszillogramm, Arterio- bzw. Aortogramm) obliterierender Arteriopathie sowie "gesunde" männliche und weibliche Vergleichspersonen etwa der gleichen Altersklassen. Dabei ergab sich:
Die Patientengruppe zeigte eine signifikant erhöhte Heparintoleranz in vivo und in vitro gegenüber den Vergleichsgruppen. Die mit der in-vivo-Methode untersuchten Gruppen waren zahlenmässig für eine statistische Berechnung ausreichend (54 Patienten, 24 männliche und 42 weibliche Vergleichspersonen). Der Unterschied in der Reaktion auf das injizierte Heparin konnte zwischen Patienten und Vergleichspersonen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p\ 0,01\%$ statistisch hoch gesichert werden. Die Ergebnisse der Heparintoleranzteste in vitro entsprachen, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt.
4. Diese Resultate wurden diskutiert und mit Ergebnissen anderer Autoren verglichen. Zur Erklärung wurde das Vorliegen eines verminderten Niveaus von heparinoiden Substanzen im Blut herangezogen, wobei morphologische und biochemische Befunde von anderer Seite im gleichen Sinne interpretiert werden konnten.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Bally, P.R.: Über die klinische Bedeutung des Heparins mit besonderer Berücksichtigung der Heparinbelastung als diagnostisches Mittel, Zeitschrift für klinische Medizin. 148, 295 (1951)
2. Bay, C.: L'extrait de sangue amplificateur du temps de coagulation. Son intérêt dans la conduite des traitements anticoagulants. Presse Med. 299 (1952)
3. Beaumont, J.L. &
 Lenegre, J.: La crase sanguine danks les thromboses des arteres coronaires et pulmonaires; deductions thérapeutiques. Rev. Hematol 7, 228 (1952)
4. Burstein, M.
 Guinand A.: De Quelques Heparinoides De Synthese. Sang 27:558 (1956)
5. Chaikoff I.L., Lindsay
 F.W., Entenman C.: Production of athermatosis in the aorta of the bird by administration of diethylstilbestrol, Journal of experimental Medicine, 88, 373 (1948)
6. De Takats, G. &
 Gilbert, N.G.: The Response to Heparin: A Test of the Clotting Mechanism. Journal of the American Medical Association. 121, 1246 (1943)
7. De Takats, G.: Sensitized Clotting Time, Journal of American Medical Association 146, 1370 (1951)
8. Duguid, J.B.: Pathogenesis of Arterial Narrowing. Symposium über Arterisklerose, Basel 8 - 10 August (1956)
9. Gofman, J.W.,
 Strisower, E., Delalla,
 O., Tampling, A.,
 Jones, H.B., Lingrenf:
 Index of Coronary Atherogenesis, Modern. Med. 119, 15. Juni 1953
10. Eiber Harold, B.: MD Dansihfsky Isidore PHD New York, Synthesis and Metabolism of Radioactive Heparin Archives of Internal Medicines 102, (1958)
11. Fabre A. & Bonparis, A.: Suveillance biologique de la therapeutique anticoagulante, Presse Med. 1952 273
12. Fonio, A.: Schweizer Medizinische Wschr. 84, 785 (1954)

13. Giacomazzi, G.: Sang 29: 614 (1958)
14. Hagedorn, A.B. & Barker, N. W.: Response of Persons with or without intravascular Thrombosis to a Heparin Tolerance Test, American Heart Journal 35, 603 (1948)
15. Hahn, P.F.: Abolishment of alimentary lepaemia following injection of heparin, Science 98 (1943)
16. Hess, H., Kunlin, J., Mittelmeier, H., Schlicht, L., Stampfl, B.: Die obliterierenden Gefässerkrankungen. Herausgeber Hess H. - München - Berlin, Urban und Schwarzenberg (1959)
17. Houck, J.C.U. Mitarb.: Proc. Soc. Exp. Biol. 46: 528 (1958)
18. Howell Brinkhaus u. Melanby zitiert bei Deutsch Erwin: Blutgerinnungsfactoren Wien, Deuticke 1955
19. Jorpes, E. und Cordell, S.: Journal of Biological Chemistry 176, 267 (1948)
- 20 a. Koller F.: Über die klinische Bedeutung der Blutgerinnungsstörungen, Schweizer Medizinische Wochenschrift 1945, 190
- 20 b. Schwarz E., Usteri, C. & Koller F.: Heparinresistenz und Heparinüberempfindlichkeit. Acta Haem. 4, 148 (1950)
21. O'Brien J.R.: Heparin and Christmas Factor, Nature 181, 1801 (1958)
22. Pick, R., Stamler, J. Rodbards, Katz L.N.: Estrogen induced Regression of Coronary Atherosclerosis in Choesterol-FED Chicks Circulation 6, 273, 1952
23. Quick, A.J.: Normal Antithrombin of Blood and its Relation to Heparin American Journal of Physiology 123, 712 (1948)
24. Rosenbaum, E.E. and Barker N.W.: A test of the Coagulation Time of Blood Heparinized in vitro. Journal of Laboratory and Clinical Medicin. 35, 699 (1950)
25. Rotter-Giesen: Arterisklerose, Nauheimer Fortbildungs-Lehrgänge 23, Darmstadt 1958
26. Sigg, B.: Der Mikroheparintest, Klinische Wochenschrift 30 205, (1952)

27. Sigg, B.: Prothrombinzeit und Heparintoleranz-Test bei Hyperkoagulabilität des Blutes. Schweizer Medizinische Wochenschrift 82, 762 (1952)
28. Sigg, B.: Der Heparintoleranztest. Schweizer Medizinische Wochenschrift 82, 284 (1952)
29. Snellman I.S. Bengt, J. Christina: Analysis of the Native Heparin Lipoprotein Complex including the identification of a Heparin complement (Heparin co-faktor) obtained from extracts of tissue mast cells. Biochim. biophys. Acta 7: 98 (1951)
30. Soulier, J.P. & le Bolloch, A.G.: Le test de tolerance á l'héparine in vitro Rev. Hematol. 5, 148 (1950)
31. Soulier, J.P. , le Bolloch, A.G.: The vitro Heparin Tolerance Test in the Control of Dicumarol Therapy. Acta Medica Scandinavia. 140, 132 (1951)
32. Soulier, J.P.P.: Test de tolerance a l'héparine in vitro. Annals Biol. Clin. 10, 82 (1952)
33. Theilen E.O. Carr, T.L. & Fowler, W.M.: The Effect of Intravenous Administration of Commercial Beef Heparin on the Thrombocyte Count and Heparin Sensitivite in Man Journal of Laboratory and Clinical Medicin. 35, 699 (1950)
34. Velchielt, G.: Heparin ähnlicher Effekt von Follikel-Ovarienextrakt (Minerva Gynecologica 7 (324-343) Mai 31. 1955)
35. A. Walcher N., Goossens, H., Hess und W. Stumpf: Heparintoleranz und Gerinnungsfaktoren bei obliterierender Arteriopathie aus "Klinische Wochenschrift" Sept. 952 (1960)
36. Waugh, T.R. & Ruddick, D.W.: A Test for Increased Coagulability of the Blood. Canadian Medical Association Journal. 50, 547 (1944)
37. Wenger, H.: Heparinbelastung bei verschiedenen Krankheitsgruppen, Diss. Zürich, 1949.
38. Witz, J. & Stuber A: Application en chirurgie du test de tolerance a l'héparine in vitro. Presse Med. 1952 45.

Herrn Professor Dr. W. SEITZ danke ich ganz besonders für die Festlegung des Themas der vorliegenden Arbeit.

Den Herren Dozent Dr. med. H. HESS und Dr. med. A. WALCHER bin ich zu verbindlichem Dank verpflichtet für ihre Hilfe bei der experimentellen Durchführung der Versuche und Auswertung der Ergebnisse.

L E B E N S L A U F

Ich, Hector Samaniego, wurde am 20. Januar 1931 in El Paso in Texas, USA, als Sohn des Ramon Samaniego geboren. 1937 trat ich in die Volksschule ein. Von 1945 bis 1949 besuchte ich die Oberschule und im September 1949 trat ich ins College ein. 1955 absolvierte ich in meiner Heimatstadt am Texas Western College der Universität Texas die Fakultät für Biologie und Chemie mit einem B.A. Diplom.

Während meines Studiums war ich von 1953 bis 1955 bei der amerikanischen Marine aktiv tätig.

Seit dem Winter-Semester 1955 war ich an der Medizinischen Fakultät der Universität München immatrikuliert, wo ich im Wintersemester 1960/61 die ärztliche Prüfung mit Erfolg bestand.



